

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57-96260

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 33/54  
C 08 F 8/32  
// C 08 J 3/20

識別記号

庁内整理番号  
7906-2G  
6946-4J  
7180-4F

④ 公開 昭和57年(1982)6月15日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑭ 免疫活性微粒子

① 特 願 昭55-172563

② 出 願 昭55(1980)12月9日

⑦ 発 明 者 保坂俊太郎  
鎌倉市手広1111番地東レ株式会  
社基礎研究所内

⑦ 発 明 者 村尾康雄

鎌倉市手広1111番地東レ株式会  
社基礎研究所内

⑩ 出 願 人 東レ株式会社  
東京都中央区日本橋室町2丁目  
2番地

⑭ 代 理 人 弁理士 斉藤武彦 外1名

明 細 書

1. [ 発 明 の 名 称 ]

免疫活性微粒子

2. [ 特 許 請 求 の 範 疇 ]

(1) グリンジルアクリレートおよび(または)グリンジル  
メタクリレートと、(2)炭素炭素不飽和二重結合を有する水  
溶性単糖体との共重合体からなる平均直径が0.03~1.0  
μmの微粒子に、アミノ基を有する免疫活性物質が共有結  
合によつて固定化されていることを特徴とする免疫活性微  
粒子。

3. [ 発 明 の 詳 細 な 説 明 ]

本発明は免疫学的検査用試薬として有効な免疫活性微粒  
子に関し、特に粒子状担体に免疫活性物質を固定化してな  
る免疫活性粒子を用いてヒト又は動物の体液中の成分を検  
出若しくは測定又は細胞を識別する免疫学的検査用試薬と

して有効な免疫活性微粒子の改良に関する。

抗原と抗体との反応を利用してその一方を免疫学的に検  
出又は定性する場合に、測定したい物質に結合する側の物  
質を粒子状担体に固定化させておき、その粒子が被測定物  
質の存在下で凝集を起こす現象を利用して高感度の測定を  
行なう方法は免疫学的臨床検査の重要な手段となつている。  
また逆に測定したい物質を粒子状担体に固定化させておき、  
その被測定物質と特異的に反応する抗原又は抗体の存在に  
よる被測定物質固定粒子の凝集が、被検液中の被測定物質  
の存在により阻止されることにより被測定物質を検出又は  
定量する方法も免疫学的臨床検査において広く用いられて  
いる。また特定の細胞と選択的に結合する物質を粒子状担  
体に固定化させておき、その粒子が細胞に結合するか否か  
によつて細胞の識別を行なう方法も免疫学的検査の手段と  
してしばしば採用されている。

このような免疫活性粒子を用いた免疫学的検査用試薬における粒子状担体としては、従来、ヒトを含む哺乳動物や鳥類の赤血球、カオリンや炭素など無機物の粒子、天然ゴムラテックスやポリスチレンなどの有機高分子化合物のラテックスが凝集反応用として広く用いられている。これらのうち赤血球は多種類の抗原・抗体を固定化することが可能で応用範囲が最も広い。しかし採取する動物個体によって品質等に差があること、安定性に難があり保存が難しいこと、またヒト血清により非特異的に凝集する場合があることなどの問題点がある。非生物由来の粒子として最も広く用いられているのはポリスチレン粒子であり、これは高分子化合物であるところから品質を一定にすることが可能でまたそれ自体では安定である。ポリスチレンは疎水性で種々の蛋白質を吸着する性質があるため、通常ポリスチレンへの抗原又は抗体の固定は物理吸着によつて行なわ

ジェンコポリマー、カルボキシル化ポリスチレン、アミノ基をもつカルボキシル化ポリスチレン、アクリル酸ポリマー、アクリロニトリルポリマー、メタクリル酸ポリマー、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレンコポリマー、ポリ酢酸ビニルアクリレート、ポリビニルピリジン、塩化ビニル-アクリレートコポリマーなど種々のラテックスポリマーにカルボジイミドを縮合剤としてヒト絨毛性コーナドトロピン、ヒト血清アルブミン又は変性ガンマグロブリンをアミド結合を介して縮合させた粒径0.01~0.9ミクロンの粒子からなる試薬(特公昭53-12966)、メタクリル酸、2-ヒドロキシエチルメタクリレート及びメチルメタクリレートを共重合して製造したヒドロキシル基とカルボキシル基を含有するメチルメタクリレート系ラテックスにトレボネマ抗原を臭化シアノゲン又はカルボジイミド法で結合させた試薬(臨床病理27、補冊、522頁

れる。しかし物理吸着によつて抗原又は抗体を固定化した場合には固定化した抗原(又は抗体)と遊離の抗原(又は抗体)との間に平衡が存在し、そのため測定の目的物質である対応する抗体(又は抗原)に対し粒子に固定化した抗原(又は抗体)と遊離の抗原(又は抗体)との間に競争反応が起こり、その競争反応は凝集に対して抑制的に作用する。その結果、多くの例において感度と安定性の不足が指摘されている。また当然のことながらポリスチレンに対して物理的に吸着されにくい物質は固定化することができない。これらの問題点のためにポリスチレン粒子は赤血球を担体とする場合に比較して限られた範囲でしか実用に供されていない。これらの問題点の解決を図る目的で最近、スチレン-メタクリル酸コポリマーラテックスにヒト絨毛性ゴナドトロピンをカルボジイミドを使用して結合させた試薬(DT 2,649,218)、カルボキシル化スチレン-ブタ

(1978))、ポリスチレン粒子を芯として、それをスチレン-グリシジルメタクリレートコポリマーの外皮で被覆したラテックスの遊離エポキシ基とヒト絨毛ゴナドトロピン又はインシュリンを反応させて、それらをラテックスに結合させた試薬(特公開昭55-110118)など、共有結合により抗原又は抗体を担体に結合させた試薬が提案されている。これら先行技術においてはカルボジイミドにより免疫活性物質を粒子に結合させる方法が多用されているが、カルボジイミドを使用すると免疫活性物質分子間および分子内の縮合反応を惹起する。これはのぞましくない副反応であつて免疫活性物質の活性を損なうものである。臭化シアノゲンを用いれば免疫活性物質分子間および分子内の縮合反応を回避することはできるが、この場合にはヒドロキシル基を有するポリマーと臭化シアノゲンとの反応の再現性を得ることが難しく、その結果免疫活性物質を固定化

した粒子の免疫活性が変動しやすい。これらの免疫活性物質固定化法に比較して重合体に導入された遊離エポキシ基と蛋白質又はポリペプチドを反応させる方法は免疫活性の失活も少なく再現性も良好である。しかしエポキシ基を利用する上記先行技術においては重合体粒子表面がステレンのような疎水性化合物の共重合体であるため蛋白質を非特異的に吸着する傾向を有している。一般にヒト又は動物の体液中には多種類の蛋白質が含まれ、とくに血漿又は血清中にはこれが高濃度で含有されている。検体体液から蛋白質が担体粒子に吸着されると、それが目的とする抗原-抗体反応などの免疫学的反応に干渉し、凝集反応の選択性や感度の低下をもたらすおそれがある。本発明者らはこのような問題点を解消することを目的に検討を行なった結果、本発明に到達した。

本発明は、(1)グリシジルアクリレートおよび(または)

グリシジルメタクリレートと、(2)炭素炭素不飽和二重結合を有する水溶性単量体との共重合体からなる平均直径が $0.05 \sim 10 \mu m$ の微粒子に、アミノ基を有する免疫活性物質が共有結合によつて固定化されていることを特徴とする免疫活性微粒子を提供するものであり、該微粒子は免疫学的検査用試薬として著効を示す。本発明によれば免疫活性物質はそのアミノ基と微粒子表面の遊離エポキシ基との反応によつて生成する共有結合によつて担体微粒子上に固定化される。免疫活性物質との反応によつて遊離エポキシ基が全部消費されずに活性を有するまま残存する可能性がある場合には血清アルブミン、セラチンなど目的とする免疫学的検査に干渉しない親水性蛋白質を遊離エポキシ基と反応させることによつて、エポキシ基の反応性を失わせることができる。その際エポキシ基消去用の親水性蛋白質は固定化の目的である免疫活性物質と混合して同時に反応さ

せてもよく、また免疫活性物質を先に単独で反応させてその後で反応させてもよい。また上記アルブミンやセラチンなどの親水性蛋白質の代りにグリシン、アラニンなどのアミノ酸を用いることも可能である。このようにして免疫活性物を固定化した後に重合体微粒子表面で何らの結合物によつて覆われることなく露出しているのは、水溶性単量体由来する親水性部分である。蛋白質は水性媒体中では親水性重合体には吸着しにくいので、本発明による免疫活性物質固定化微粒子は、検体体液に対して安定で非特異的凝集を起さなく、また細胞に対する非特異的付着がない。

本発明において共重合に用いる水溶性単量体とはその単独重合体が水溶性重合体を形成しうるものであり、例えば2-オキシエチルアクリレート、2-オキシエチルメタクリレート、2-オキシプロピルアクリレート、2-オキシプロピルメタクリレート、重合時2ないし2.5のポリエチ

レングリコールモノアルキルエーテルのアクリル酸エステル又はメタクリル酸エステル、アクリルアミド、メタクリルアミド、N-ビニルピロリドン、グリセロールメタクリレートなどが好ましく用いられる。これらの水溶性単量体は2種以上併用してもよい。グリシジルアクリレートとグリシジルメタクリレートとの和に対する水溶性単量体の和の比率はモル比で95:5ないし5:95の範囲で変えることができる。またグリシジルアクリレートとグリシジルメタクリレートの使用比は100:0ないし0:100(モル比)すなわち任意でよい。遊離エポキシ基はアミノ基のみでなく、カルボキシル基、アルコール性ヒドロキシル基、フェノール性ヒドロキシル基及びメルカプト基なども反応し得るが、重合体粒子の製造条件を妥当に選べばグリシジルアクリレート又はグリシジルメタクリレートのエポキシ基を副反応によつて失なうことなく免疫活性物質

の固定化に利用することができる。

本発明の重合体微粒子は例えば次の方法によつて製造することができる。

重合反応は通常乳化重合、沈殿重合又は懸濁重合によつて好ましく行なわれる。これらいずれの方法も重合と同時に重合体が粒子状になつて析出するので本発明の目的に適している。とくに好ましいのは沈殿重合である。沈殿重合は、単量体は溶解するが重合によつて生成する重合体は溶解しない媒体中で重合を行なう方法であつて、単量体と重合媒体との組合せを選択することによつて生成する重合体粒子の平均直径を0.03ないし10 $\mu$ mの範囲に入るよう調節することが比較的容易であり、粒径の分布も比較的狭い。また沈殿重合は、乳化重合や懸濁重合の場合と異なつて、乳化剤や懸濁安定剤を使用しないので、重合反応後これらの添加剤を除去する必要がないのも利点の一つである。

粒子の形状は多くの場合球形であるが球形であることは必要条件ではなく不規則な形状であつても差し支えない。不規則な形状の粒子の直径は最大径と最小径の和の1/2とする。平均直径は式(1)によつて定義される $\bar{d}$ によつて表わされる。ただし $d_i$ はi番目の粒子の直径、Nは粒子の総数である。

$$\bar{d} = \frac{N}{\sum_{i=1}^N} d_i / N \quad \dots\dots(1)$$

凝集反応が判定しやすいのは経験的に平均直径が0.1 $\mu$ m以上10 $\mu$ m以下の場合である。また細胞標識の目的には平均直径は0.03 $\mu$ m以上5 $\mu$ m以下の範囲が好ましい。また染料ないし顔料により適当に着色した粒子は凝集反応、細胞標識いずれの目的に対しても好都合である。また細胞標識に対しては蛍光を付与した粒子も好ましい。

免疫活性物質の微粒子への固定化反応は水性媒体中で行ない、pHは7.0~9.0、温度は0℃~40℃の範囲が適

特開昭57-96260(4)

架橋剤を重合系に添加することは必須ではないが、通常重合に當つて重合性炭素炭素二重結合を分子内に2つ以上含む多官能性単量体を添加して積極的に重合体を架橋させることが好ましい。そのような目的で重合系に添加するに適した多官能性単量体は多数存在するが、若干例をあげれば、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメタクリレート、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、コハク酸ジビニル、コハク酸ジアリル、メタクリル酸ビニル、メタクリル酸アリル、トリアリルソシアヌレート、トリアリルソシアヌレートなどである。また架橋結合は重合反応後生成重合体の反応性を利用してこれを多官能化合物と反応させることによつて導入することもできる。例えば生成重合体に含まれるエポキシ基とエチレンジアミンなどのジアミンとを反応させることにより重合体を架橋させることができる。

当である。反応液中の免疫活性物質の濃度は個々の免疫活性物質の性質によつて増減する必要がある一様には決められない。その際すでに述べたように血清アルブミン、ゼラチンなどの親水性蛋白質を反応液に添加することはしばしば免疫活性物質固定化微粒子の分散安定性を改良する上で有効である。また固定化反応後にグリシン、アラニンなどのアミノ酸で処理することもしばしば同様に好ましい効果をもたらす。

本発明において使用する免疫活性物質はアミノ基を有することが必要であるが、免疫活性物質の大部分は蛋白質であるかまたはポリペプチド部分を含んでいるのでその条件に適合する。ここで免疫活性物質とは抗原および抗体のみでなく、補体、Fcレセプター、C3レセプターなど液性免疫反応ないし細胞性免疫反応に関与してある物質に特異的に結合する物質を意味するものとする。具体例を若干示

げれば、梅毒トレポネーマ抗原、B型肝炎表面抗原(HBs抗原)、B型肝炎表面抗原に対する抗体(抗HBs抗体)、風疹抗原、トキソプラズマ抗原、ストレプトリジンO、抗ストレプトリジンO抗体、マイコプラズマ抗原、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)、抗HCG抗体、熱凝集ヒトIgG、リウマチ因子、核蛋白、DNA、抗DNA抗体、C反応性蛋白(CRP)、抗CRP抗体、抗エストロゲン抗体、 $\alpha$ -フエト蛋白( $\alpha$ -FP)、抗 $\alpha$ -FP抗体、癌胎児性抗原(CEA)、抗CEA抗体、C1q、抗C1q抗体、C3、抗C3抗体、抗C3b抗体、抗C3bi抗体、C4、抗C4抗体、プロテイン-A、コングルチニン、イムノコングルチニンなどである。

#### 製法例 1

グリシジルメタクリレート、2-オキシエチルメタクリレートおよびニテレンクリコールジメタクリレートの3者

水素1カリウム0.01 mol/L、塩化ナトリウム0.14 mol/L、pH 7.2、以下PBSと略記)の中に $1.0^6$  cell/mlの割合で分散させた分散液を氷水で冷却しながら10 KHzの超音波で20分間処理して菌体を破壊し、これをTP抗原液とした。このTP抗原液1容とウシ血清グロブリンを1 ml/mlの濃度でPBSに溶解した溶液3容とを混合し、その混合液1 mlと前記重合体50 mgをPBS 1 mlに分散した分散液とを混合して30℃で2時間攪拌した。次に遠沈により微粒子を分離してPBSで遠沈により3回洗浄した後、ウシ血清アルブミン(以下BSAと略記)を1%添加したPBS 20 mlに分散した。このTP抗原固定化微粒子分散液を3日間4℃の冷蔵庫中で放置した後、下記のようにして活性を測定した。

U字型管底を有するポリスチレン製のマイクロタイタープレートに、TPHA力価640の梅毒陰性血清を50  $\mu$ lずつ

#### 特開昭57-96260(6)

を85.7:9.5:4.8のモル比で混合し、その単体混合物24部(重量、以下同じ)、プロピオン酸エチル76部および2,2'-アゾビス(2,4-ジメチル-4-メトキシバレロニトリル)0.13部(4.7 mmol/L)の混合物を窒素ガス雰囲気下40℃で3時間重合させた。白濁した重合混合物をアセトンに注ぎ、1500×gで10分間遠心分離し、沈降した粒子をエタノールで再分散して洗浄、次いで再び遠心分離した。減圧下に乾燥して微粒子状重合体1.13部を得た。この微粒子状重合体は球形でその直径は1.8  $\mu$ mと4.2  $\mu$ mの間にあり平均3.3  $\mu$ m、標準偏差は0.45  $\mu$ mであった。

上記のようにして調製した重合体微粒子にTP抗原を下記のようにして固定化した。まず梅毒病原体 *Treponema pallidum* (以下TPと略記) Nichols株菌体成分をリン酸緩衝生理食塩水(リン酸水素2ナトリウム+リン酸

希釈倍率10倍を起点とする2<sup>n</sup>希釈系列で各50  $\mu$ lずつ入れた。ただし希釈用液としてはPBSにBSAを1%、梅毒補体結合反応用ライター抗原溶液KW(日本免疫学研究所)を5%、塩化アンモニウムを0.75 mol/Lの濃度で添加した溶液を使用した。またコントロールとして梅毒陰性血清についても同様の希釈液をマイクロタイタープレートに入れた。次に血清希釈液の入っているマイクロタイタープレートの各穴にTP抗原固定化微粒子分散液を各50  $\mu$ lずつ加え、3分間振盪して両液を混合した後室温で2時間静置し、沈降後によつて凝集の程度を判定した。その結果は表1の通りでTPHA以上の感度で血清中の梅毒抗体を検出できることがわかる。

表 1

希釈倍率	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560
陽性	++	++	++	++	++	++	++	++	+
陰性	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- ただし 一 底の中心にきれいな小さな輪  
 + 十より小さな輪  
 卅 小さい膜様沈澱（輪形成）  
 卅 底全部に膜様に沈澱

## 実施例 2

1 mg/ml の濃度のヒト Ig G / P B S 溶液 0.4 ml と 1 mg / ml の濃度のウシ血清グリコプロテイン / P B S 溶液 1.6 ml とを混合し、その混合液に、実施例 1 に使用したのと同じ重合体微粒子 50 mg を分散させ、30℃で3時間撹拌した。この反応混合物を4℃の冷蔵庫中で1夜放置した後沈沈により P B S で洗浄し、B S A を 1% 添加した P B S 4 ml に微粒子を再分散させ、30℃で2時間撹拌した後、4℃の冷蔵庫に1夜放置した。このようにしてヒト Ig G を固定化した重合体微粒子と抗ヒト Ig G 抗体とを次のようにして反応させた。すなわち顕微鏡用スライドガラス上で

してから4℃の冷蔵庫に1夜放置した。このようにして B S A を固定化した重合体微粒子と抗 B S A 抗血清（ウサギ）とを実施例 2 と同様にスライドガラス上で反応させた結果は表 3 の通りであった。抗 B S A 抗体検出限界は 0.1  $\mu$ g / ml であることがわかる。

表 3

抗 B S A 抗体濃度 ( $\mu$ g / ml)	10	1	0.1	0.01
凝 集	卅	卅	+	—

## 実施例 4

グリシジルメタクリレート、2-オキシエチルメタクリレートおよびエチレングリコールの3者の混合比を 7.14 : 2.38 : 4.8 (モル比) に変えた以外は実施例 1 と全く同様にして重合し、平均直径 0.1  $\mu$ m の微粒子 10.8 部を得た。この重合体微粒子を用いて実施例 3 の場合と全く同

特開昭 57- 96260 (6)

抗ヒト Ig G 抗血清（ヤギ）Ig G 分画の P B S 溶液 10  $\mu$ L と上記ヒト Ig G 固定化微粒子分散液 10  $\mu$ L とを混合し、3分後の凝集状態を肉眼で判定した。その結果を表 2 に示す。抗ヒト Ig G 抗体の検出限界は約 10 ng / ml であることがわかる。

表 2

抗ヒト Ig G 抗体濃度 (ng / ml)	10,000	1,000	100	10	1	0.1
凝 集	卅	卅	卅	+	+	—

## 実施例 3

5 mg / ml の濃度の B S A / P B S 溶液 2 ml に実施例 1 で使用したのと同じ重合体微粒子を分散させ、30℃で7時間撹拌した後4℃の冷蔵庫に1夜放置した。次いで沈沈により P B S で洗浄し、ヒト血清アルブミンを 0.5% 添加した P B S 4 ml に微粒子を再分散し、30℃で1時間撹拌

様にして B S A を固定化した。実施例 3 と同様にしてスライドガラス上で抗 B S A 抗血清と反応させた結果は実施例 3 の場合と全く同等で、抗 B S A 抗体検出限界は 0.1  $\mu$ g / ml であつた。

## 実施例 5

グリシジルメタクリレート、2-オキシプロピルメタクリレートおよびトリエチレングリコールジメタクリレートを 4.7.6 : 4.7.6 : 4.8 (モル比) の比率で混合し、その単量体混合物 2.4 部、メチル  $\alpha$ -プロピルケトン 7.6 部および 2,2'-アゾビス (2,4-ジメチル-4-メトキシパレロニトリル) 0.13 部 (4.7 mmol / L) の混合物をアルゴン雰囲気下 40℃で3時間重合させた。白濁した重合物を実施例 1 と同様に処理して重合体微粒子 8.4 部を得た。平均直径は 2.5  $\mu$ m であつた。この重合体微粒子を 0.5% ヒト血清アルブミン水溶液中に重合体含量が 12.5% にな

るように分岐し、実施例3と同様にして抗BSA抗血清とスライドガラス上で反応させた。その結果を表4に示す。

表 4

抗BSA抗体価 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	10	1	0.1
凝 集	+	±	-

## 実施例 6

グリンジルメタクリレートの代りにグリンジルアクリレートを使用しグリンジルアクリレート、2-オキシエチルメタクリレートおよびトリエチレングリコールジメタクリレートの混合比を23.8:71.4:4.8(モル比)にした以外は実施例5と同様にして重合し、平均直径約1 $\mu\text{m}$ の重合体微粒子7.2部を得た。実施例5と全く同様にしてBSAを重合体微粒子に固定化し、実施例5と同様にして抗BSA抗血清と反応させた。その結果は実施例5の場合

と同等で、抗BSA抗体検出感度は約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であつた。

## 実施例 7

実施例1の2-オキシエチルメタクリレートの代りに2-オキシエチルアクリレートを使用した以外は実施例1と全く同様にして重合し、平均直径約3 $\mu\text{m}$ の重合体微粒子9.5部を得た。この重合体微粒子に実施例1と同様にしてTP抗原の固定化を行ない活性を検定した結果、血清中の梅毒抗体検出感度は実施例1の場合と同等であつた。

特許出願人 東レ株式会社

代理人 弁理士 齊藤武彦

川 添 良 治

## 手 続 補 正 書

昭和56年3月4日

特許庁長官 島 田 春 樹 殿

## 1. 補正の表示

昭和55年特許第172563号

## 2. 発明の名称

免疫活性微粒子

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 (315) 東レ株式会社

## 4. 代理人

150

住所 東京都渋谷区根ヶ丘24番8号  
オサンマンシヨン新南平台(電話476-2571)

氏名 弁理士 (7175) 齊 藤 武 彦

## 5. 補正の対象 明細書の発明の詳述を説明の図

## 6. 補正の内容

- (1) 明細書(以下同じ)2頁9行の「固定粒子」を「固定化粒子」とする。
- (2) 5頁14行「トレボネーマ」を「トレボネーマ」とする。
- (3) 9頁11~12行の「とはその ~ ものであり、」を「としては、」とする。
- (4) 21頁下から2行の「0.1 $\mu\text{m}$ 」を「1.0 $\mu\text{m}$ 」とする。
- (5) 22頁12行の「重混合」を「重合混合」と補正する。
- (6) 23頁1行の「抗BSA抗血清」を「BSAを固定化した。そして実施例3と同様にして抗BSA抗血清」と補正する。